

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

平3-285693

⑫ Int. Cl. 3

C 12 P 21/02
C 12 N 5/10

識別記号

庁内整理番号

H 8214-4B
※

⑬ 公開 平成3年(1991)12月16日

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全18頁)

⑭ 発明の名称 ヒト肝実質細胞増殖因子の生産方法および該因子を産生する形質転換体

⑮ 特 願 平2-88592

⑯ 出 願 平2(1990)4月3日

⑰ 発明者 喜多村 直実 大阪府守口市八雲東町2丁目272番地

⑰ 発明者 仲 大地 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

⑰ 発明者 松井 理恵 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

⑰ 出願人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

⑰ 代理人 弁理士 長谷川 一 外1名

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

ヒト肝実質細胞増殖因子の生産方法および該因子
を産生する形質転換体

2. 特許請求の範囲

(1) 下記アミノ酸配列で表わされるヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られる形質転換体を培養してヒト肝実質細胞増殖因子を生産することを特徴とするヒト肝実質細胞増殖因子の生産方法。

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu
Leu Leu Gln His Val Leu Leu His Leu Leu
Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu
Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His
Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu
Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys
Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys
Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp

Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro
Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys
Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu
Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile
Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val
Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln
Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys
Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe
Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val
Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu
Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg
Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys
Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr
Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys
Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp
Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp
Glu Tyr Cys Ala Tyr Lys Thr Cys Ala Asp

Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu
 Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gin Gly Gin Gly
 Ile Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gin Arg Trp Asp
 Ser Gin Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr
 Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser
 Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro
 Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gin Ile
 Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gin Asp
 Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met
 Gly Asn Leu Ser Gin Thr Arg Ser Gly Leu
 Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu
 Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro
 Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys
 Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro
 Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro
 Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu
 Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr

- 3 -

Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro
 Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser
 Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly
 Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu
 Thr Ala Arg Gin Cys Phe Pro Ser Arg Asp
 Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile
 His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
 Cys Lys Gin Val Leu Asn Val Ser Gin Leu
 Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val
 Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu
 Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro
 Asn Tyr Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr
 Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr
 Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
 Lys Cys Ser Gin His His Arg Gly Lys Val
 Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly
 Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu
 Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu
 Gin His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val

- 4 -

Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro
 Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala
 Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser *

(2) 下記塩基配列で表わされる、ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られる形質転換体を培養してヒト肝実質細胞増殖因子を生産することを特徴とするヒト肝実質細胞増殖因子の生産方法。

ATG TGG GTG ACC AAA CTC CTG CCA GCC CTG
 CTG CTG CAG CAT GTC CTC CTG CAT CTC CTC
 CTG CTC CCC ATC GCC ATC CCC TAT GCA GAG
 GGA CAA AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT
 GAA TTC AAA AAA TCA GCA AAG ACT ACC CTA
 ATC AAA ATA GAT CCA GCA CTG AAG ATA AAA
 ACC AAA AAA GTG AAT ACT GCA GAC CAA TGT
 GCT AAT AGA TGT ACT AGG AAT AAA GGA CTT
 CCA TTC ACT TGC AAG GCT TTT GTT TTT GAT
 AAA GCA AGA AAA CAA TGC CTC TGG TTC CCC

TTC AAT AGC ATG TCA AGT GGA GTG AAA AAA
 GAA TTT GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA
 AAC AAA GAC TAC ATT AGA AAC TGC ATC ATT
 GGT AAA GGA CGC ACG TAC AAG GGA ACA GTA
 TCT ATC ACT AAG AGT GGC ATC AAA TGT CAG
 CCC TGG AGT TCC ATG ATA CCA CAC GAA CAC
 AGC TTT TTG CCT TCG AGC TAT CGG GGT AAA
 GAC CTA CAG GAA AAC TAC TGT CGA AAT CCT
 CGA CGG GAA GAA GGG GGA CCC TGG TGT TTC
 ACA AGC AAT CCA GAG GTA CGC TAC GAA GTC
 TGT GAC ATT CCT CAG TGT TCA GAA GTT GAA
 TGC ATG ACC TGC AAT GGG GAG AGT TAT CGA
 GGT CTC ATG GAT CAT ACA GAA TCA GGC AAG
 ATT TGT CAG CGC TGG GAT CAT CAG ACA CCA
 CAC CGG CAC AAA TTC TTG CCT GAA AGA TAT
 CCC GAC AAG GGC TTT GAT GAT AAT TAT TGC
 CGC AAT CCC GAT GGC CAG CCG AGG CCA TGG
 TGC TAT ACT CTT GAC CCT CAC ACC CGC TGG
 GAG TAC TGT GCA ATT AAA ACA TGC GCT GAC
 AAT ACT ATG AAT GAC ACT GAT GTT CCT TTG

- 5 -

- 6 -

GAA ACA ACT GAA TGC ATC CAA GGT CAA GGA
 GAA GGC TAC AGG GGC ACT GTC AAT ACC ATT
 TGG AAT GGA ATT CCA TGT CAG CGT TGG GAT
 TCT CAG TAT CCT CAC GAG CAT GAC ATG ACT
 CCT GAA AAT TTC AAG TGC AAG GAC CTA CGA
 GAA AAT TAC TGC CGA AAT CCA GAT GGG TCT
 GAA TCA CCC TGG TGT TTT ACC ACT GAT CCA
 AAC ATC CGA GTT GGC TAC TCC CAA ATT
 CCA AAC TGT GAT ATG TCA CAT GGA CAA GAT
 TGT TAT CGT GGG AAT GGC AAA AAT TAT ATG
 GGC AAC TTA TCC CAA ACA AGA TCT GGA CTA
 ACA TGT TCA ATG TGG GAC AAG AAC ATG GAA
 GAC TTA CAT CGT CAT ATC TTC TGG GAA CCA
 GAT GCA AGT AAG CTG AAT GAG AAT TAC TGC
 CGA AAT CCA GAT GAT GAT GCT CAT GGA CCC
 TGG TGC TAC ACG GGA AAT CCA CTC ATT CCT
 TGG GAT TAT TGC CCT ATT TCT CGT TGT GAA
 GGT GAT ACC ACA CCT ACA ATA GTC AAT TTA
 GAC CAT CCC GTA ATA TCT TGT GCC AAA ACG
 AAA CAA TTG CGA GTT GTA AAT GGG ATT CCA

- 7 -

AAT CGT CCT GGT ATT TTT GTC CGA GTA GCA
 TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC AAA ATT ATT
 TTA ACA TAT AAG GTA CCA CAG TCA TAG

(3) 下記アミノ酸配列で表わされるヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体に対し、さらに該ヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターを用いて繰り返し形質転換し、得られる形質転換体を培養してヒト肝実質細胞増殖因子を生産することを特徴とするヒト肝実質細胞増殖因子の生産方法。

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu
 Leu Leu Gln His Val Leu Leu His Leu Leu
 Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu
 Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His
 Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu
 Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys
 Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys
 Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp

- 9 -

ACA CGA ACA AAC ATA GGA TCG ATG GTT ACT
 TTG AGA TAC AGA AAT AAA CAT ATC TGC GGA
 GGA TCA TTG ATA AAG GAG AGT TGG GTT CTT
 ACT GCA CGA CAG TGT TTC CCT TCT CGA GAC
 TTG AAA GAT TAT GAA GCT TGG CTT GGA ATT
 CAT GAT GTC CAC GGA AGA GGA GAT GAG AAA
 TGC AAA CAG GTT CTC AAT GTT TCC CAG CTG
 GTA TAT GGC CCT GAA GGA TCA GAT CTG GTT
 TTA ATG AAG CTT GCC AGG CCT GCT GTC CTG
 GAT GAT TTT GTT AGT ACG ATT GAT TTA CCT
 AAT TAT GGA TGC ACA ATT CCT GAA AAG ACC
 AGT AGC AGT GTT TAT GGC TGG GGC TAC ACT
 GGA TTG ATC AAC TAT GAT GGC CTA TTA CGA
 GTG GCA CAT CTC TAT ATA ATG GGA AAT GAG
 AAA TGC AGC CAG CAT CAT CGA GGG AAG GTG
 ACT CTG AAT GAG TCT GAA ATA TGT GCT GGG
 GCT GAA AAG ATT GGA TCA GGA CCA TGT GAG
 GGG GAT TAT GGT GGC CCA CTT GTT TGT GAG
 CAA CAT AAA ATG AGA ATG GTT CTT GGT GTC
 ATT GTT CCT GGT CGT GGA TGT GCC ATT CCA

- 8 -

Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro
 Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys
 Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu
 Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile
 Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val
 Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln
 Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys
 Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
 Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe
 Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val
 Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu
 Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg
 Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys
 Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr
 Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys
 Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp
 Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp
 Glu Tyr Cys Ala Tyr Lys Thr Cys Ala Asp

—649—

- 10 -

Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu
 Glu Thr Thr Glu Cys Ile Glu Gly Gln Gly
 Ile Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp
 Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr
 Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser
 Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro
 Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile
 Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp
 Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu
 Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu
 Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro
 Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys
 Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro
 Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro
 Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu
 Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr

- 11 -

Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro
 Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser
 Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly
 Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu
 Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp
 Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile
 His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu
 Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val
 Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu
 Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro
 Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr
 Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr
 Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val
 Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly
 Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu
 Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu
 Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val

- 12 -

Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro
 Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala
 Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser *

(4) 下記アミノ酸配列で表わされるヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターで形質転換して得られるヒト肝実質細胞増殖因子を产生する動物細胞。

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu
 Leu Leu Gln His Val Leu Leu His Leu Leu
 Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu
 Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His
 Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu
 Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys
 Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys
 Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp
 Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro
 Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys
 Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu

- 13 -

Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile
 Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val
 Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln
 Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys
 Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
 Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe
 Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val
 Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu
 Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg
 Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys
 Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr
 Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys
 Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp
 Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp
 Glu Tyr Cys Ala Tyr Lys Thr Cys Ala Asp
 Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu
 Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly
 Ile Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile

- 14 -

Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp
 Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr
 Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser
 Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro
 Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile
 Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp
 Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu
 Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu
 Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro
 Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys
 Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro
 Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro
 Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu
 Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr
 Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro
 Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser
 Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly

- 15 -

Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser *

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は少なくとも蛋白質発現に必要なプロモーター配列、シグナルペプチド様配列、ヒト肝実質細胞増殖因子をコードするDNA配列及びタミネーター配列を有する発現ベクターにより形質転換された形質転換体、さらにその形質転換体を培養することによりかかるヒト肝実質細胞増殖因子を产生する方法に関する。

(従来の技術)

肝臓は、生体中唯一再生可能な臓器である。この肝再生現象は肝移植実験や体液交流実験などから何らかの液性因子によることが示唆されてきた。近年、本発明者らは肝実質細胞を生体内より取り出し生体外においてその増殖を促進させるヒト由来の蛋白性因子すなわち、ヒト肝実質細胞増殖因子(以下「hHGF」と略す。)を創症肝炎患者血漿より見いだし(バイオメディカルリサーチ(Biomed. Res.)6巻231頁(1985)及びエクスペリメ

Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu
 Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp
 Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile
 His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu
 Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val
 Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu
 Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro
 Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr
 Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr
 Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val
 Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly
 Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu
 Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu
 Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val
 Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro
 Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala
 Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile

- 16 -

ンタルセルリサーチ(Exp. Cell. Res.)166巻139頁(1986)、世界で初めて単一の蛋白質として精製することに成功した(特開昭63-22526号公報及びジャーナルオブクリニカルインベステイゲーション(J. Clin. Invest.)81巻414頁(1988))。さらにhHGF蛋白質をコードする遺伝子を並置するに至った(特許出願清(特願平1-209449号)及びバイオケミカルバイオフィジカルリサーチコミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Comun.)163巻967頁(1989))。

このhHGF蛋白質はシグナルペプチド配列から数え、494個のアミノ酸からなるH鎖ペプチドと234個のアミノ酸からなるL鎖ペプチドより構成される蛋白質で少なくとも4箇所に糖鎖結合部位を持つことを特徴とする。これら2つのペプチド鎖はジスルフィド結合(S-S結合)により結合しており、肝実質細胞の増殖を生体外に於いて促進する活性が認められている(バイオケミカルバイオフィジカルリサーチコミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Comun.)163巻967頁(1989))。各ペプチド鎖

- 17 -

- 18 -

の遺伝子は H 鎮及び L 鎮ペプチドの順に速なった形でコードされている。そのため一本の RNA 上に転写され、同時に一つの蛋白質として翻訳される。その後 N 末端側に存在するシグナル様配列の切断除去が起こりさらにそれ以降の一本の蛋白鎖が二本に切断される。これによって生じた二本のペプチド鎖は S-S 結合を介して機能的な蛋白質を形成すると考えられる。

(発明が解決しようとする問題点)

この hHGF 蛋白質の生化学的ならびに生理的機能を明らかにすることは肝再生機構の解明のみならず、生体外における安定な肝実質細胞の供給ならびに肝疾患に対する治療薬の開発に重要な役割を担ってくる。しかしながら hHGF 蛋白質の生体における詳細な機能、あるいは肝障害時における肝再生に対する hHGF 蛋白質の効果等を調べるためにには多量の hHGF 蛋白質を必要とする。

ところが現在に至るまで hHGF 蛋白質を取得する方法としては、劇症肝炎患者血漿を材料として、その中に微量に存在する hHGF 蛋白質の精製

を行わざるをえなかった。この方法は人的、時間的、価格的に必ずしも容易な方法ではなく、またウイルスなどを始めとした感染源の存在する患者血漿中から微量な hHGF 蛋白質のみを安定にとりだすことは困難を極める。これらの理由から劇症肝炎患者血漿を材料とした hHGF 蛋白質の安定かつ大量の精製は行われていなかった。

(問題点を解決するための手段)

そこで本発明者らは、hHGF 蛋白質を粗換え DNA 技術により安定かつ大量に取得するため種々の検討をした結果、この目的に有用な hHGF 蛋白質をコードする遺伝子を含む発現ベクターを新たに構築し hHGF 蛋白質の発現を可能にした。

即ち、本発明の要旨は、第 2 図で表わされる hHGF 遺伝子を有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、得られる形質転換体を培養して hHGF を生産することを特徴とする hHGF の生産方法および該因子を産生する形質転換体に存する。

以下に、本発明を説明する。

hHGF 蛋白質の工業生産のためには、その蛋白質

- 19 -

- 20 -

発現が安定した宿主-ベクター系を選択すること、さらに発現した hHGF 蛋白質が生物学的活性すなわち肝実質細胞の増殖活性を有している必要がある。特に天然の hHGF 蛋白質が糖蛋白質であること、また hHGF 蛋白質が多くのシステイン残基を含み、そのシステイン残基間のチオール結合の位置および蛋白質の高次構造が活性維持に重要であることを考慮する必要がある。

このような場合、宿主としては酵母や大腸菌例えれば、Saccharomyces cerevisiae 株や Escherichia coli YA-21 株等の微生物も使用することが出来るが、動物細胞例えれば CHO 細胞、COS 細胞、マウス L 細胞、マウス C127 細胞、マウス FM3A 細胞等を用いて上記遺伝子を発現させることが望ましい。またこれらの細胞を宿主とする場合は、第 1 図に示す DNA 配列中に含まれるシグナル様配列すなわち 1 から 87 番目、1 から 93 番目を含む未成熟の hHGF 遺伝子を細胞内に導入することにより、成熟型 hHGF 蛋白質が細胞外に分泌生産されることが期待されるという利点が挙げられる。

- 21 -

-652-

本発明において用いられる発現ベクターは、そのプロモーター下流に hHGF 蛋白質の一部または全部のアミノ酸配列をコードする DNA 断片を有する。

プロモーターとしては、種々のプロモーターが報告されているが、本発明においては、SV40 プロモーターまたはメタロチオネイン遺伝子のプロモーターが好ましい。このプロモーターの下流に前述のシグナル様配列を含む未成熟の hHGF 遺伝子の DNA 断片を転写方向に従って挿入する。この場合、hHGF 遺伝子の DNA 断片を 2-3 個結合したもの挿入してもよいし、また、hHGF 遺伝子の DNA 断片の 5' 上流側にプロモーターを結合した DNA 断片を単位とし、転写方向を揃えて 2-3 個結合したもの挿入してもよい。

上記 hHGF 遺伝子には、その下流にポリアデニル化部位が存在することが必要である。例えは、SV40DNA、β-グロビン遺伝子またはメタロチオネイン遺伝子由来のポリアデニル化部位が hHGF 遺伝子の下流に 1 つ存在することが必要である。ま

- 22 -

た、hHGF 遺伝子にプロモーターを結合した DNA 断片を 2-3 個タンデムに挿入する方法を用いた場合には、各 hHGF 遺伝子の 3' 側にそれぞれポリアデニル化部位を存在させることができある。

上記の発現ベクターを用いて動物細胞例えは CHO 細胞を形質転換する際には、選択マーカーを用いることが望ましい。選択マーカー遺伝子を該発現ベクターのポリアデニル化部位下流に順方向あるいは逆方向に挿入しておくと、形質転換体を得る際に、選択マーカー遺伝子を含む別のプラスミドを二重形質転換する必要がない。このような選択マーカーとしては、メトトレキセート耐性を与える DHFR 遺伝子(ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー (J. Mol. Biol.) 159巻 601頁 (1982))、抗生物質 G-418 耐性を与える Neo 遺伝子(ジャーナルオブモレキュラーバイオロジイ・アンド・ジェネティクス (J. Mol. Appl. Genet.) 1巻 327頁 (1982))、ミコフェノール酸耐性を与える大腸菌由来の Ecogpt 遺伝子(プロシーディングアンドナショナルアカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 78巻

- 23 -

転換体を容易に選択できる。

以上のような方法で、選択される hHGF 蛋白質遺伝子を含有する細胞について選択マーカーを変更して二重形質転換を繰り返すことは、約 20 倍程度発現量を上昇させ得るので好ましい。

発現ベクターの動物細胞への導入はリン酸カルシウム法(ビルオオジ (Virology) 52巻 456頁 (1973))、エレクトロポレーション法(ジャーナルオブメンブレンバイオロジー (J. Membr. Biol.) 10巻 279頁 (1972))等が挙げられるが、リン酸カルシウム法が一般的である。

形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培養または付着培養で行うことができる。培地としては、MEM、RPMI 1640などを用い、5-10% 血清存在下もしくは適量のインシュリン、デキサメサゾン、トランスフェリンの存在下、もしくは無血清下にて培養する。

hHGF 蛋白質を產生している動物細胞はその培養上清中に產生された hHGF 蛋白質を分泌することから、この粗換え体の培養上清を用い hHGF 蛋白

2072頁 (1981))、抗生物質ハイグロマイシン耐性を与える hph 遺伝子(モレキュラーセルバイオロジー (Mol. Cell. Biol.) 5巻 410頁 (1985))等が挙げられる。これらの各耐性遺伝子の 5' 上流側にはプロモーター、例えば前述の SV40 由来のプロモーターが挿入されており、また、各耐性遺伝子の 3' 下流側には、前述のポリアデニル化部位が含まれる。

発現ベクターに上記のような選択マーカー遺伝子が挿入されていない場合には、形質転換体の選択のマーカーを有するベクター例えは pSV2neo(ジャーナルオブモレキュラーバイオロジイ・アンド・ジェネティクス (J. Mol. Appl. Genet.) 1巻 327頁 (1982))、pMBG(ネイチャー (Nature) 294巻 228頁 (1981))、pSV2gpt(プロシーディングアンドナショナルアカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 78巻 2072頁 (1981))、pAd-D26-1(ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー (J. Mol. Biol.) 159巻 601頁 (1982)) (J. Mol. Biol. 159, 601 (1982))などを hHGF 遺伝子の発現ベクターと共に二重形質転換し、選択マーカー遺伝子の表現形質により形質

- 24 -

質の分離精製を行うことが可能である。具体的には生産された hHGF 蛋白質を含む培養上清を各種クロマトグラフィー、例えば、S-セファロース、ヘパリンセファロース、ハイドロキシアバタイトもしくは硫酸化セルロファイン等を組み合わせたクロマトグラフィーにて精製することにより、hHGF 蛋白質を単離精製することができる。

(実施例)

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

[I] hHGF 蛋白質発現プラスミドの調製

第 3 図に hHGF 蛋白質発現プラスミドの調製方法を示す。hHGFcDNA(バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (B.B.R.C 第 163巻 (2) 967頁 - 973頁 (1989)) を含む Bam HI-Kpn I 断片すなわち hHGF 蛋白質開始点 ATG より 27 塩基上流の Bam HI 切断点から終止コドン TAG より 8 塩基上流の Kpn I 切断点まで

- 25 -

-653-

- 26 -

の領域をカバーする約 2.3kb の Bam HI-Kpn I 断片を含むプラスミド pUCHGF1DNA を常法（「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ、93頁(1982)）により調製した。

次に該プラスミド DNA 10 μ g を常法に従い制限酵素 Kpn I で切断し、得られた DNA 断片を常法に従いフェノール・クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿により該 DNA 断片を精製し 10 μ g の水に溶解した。

さらにこの DNA 断片の Kpn I 切断点に第 3 図に示す両末端が制限酵素 Kpn I 切断点をもちかつ内部に終止コドン TGA 及び制限酵素 Bam HI 切断点を含む 32 塩基の合成リinker を Maniatis らの方法（「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ、396頁-397頁(1982)）に従い導入した。

これを用いて常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体よりプラスミド DNA を常法（「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ、396頁-397頁(1982)）に従い調製した。

- 27 -

は予め常法に従い平滑末端を生じる制限酵素 Sma I で切断し、フェノール・クロロホルム抽出を行いエタノール沈殿により精製した。これを 400 μ g の 50 mM トリス-塩酸 (pH 8)、1 mM 塩化マグネシウム 溶液に溶解したのちバクテリアルアルカリホスファターゼ(東洋紡、BAP-101)1 ユニットを添加し、65°C 下 30 分の反応を施し脱磷酸化処理を行った。次にこの反応液からフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿により該 DNA 断片を精製し 10 μ g の水に溶解した。

上記の様に調製した pKCR ベクターの DNA 断片 0.01 μ g と前述の平滑末端化された hHGFcDNA の Bam HI 断片 0.1 μ g を含む反応液 (66 mM トリス-塩酸 pH 7.6、6.6 mM 塩化マグネシウム 10 mM ジチオスレイトール、66 μ MATP) 20 μ l 中にて 14°C で 12 時間 T4DNA リガーゼ(東洋紡 LGA-101)による結合反応を行った。この T4DNA リガーゼ反応液 10 μ l を用いて大腸菌 HB 101 株(宝酒造)を説明書に従い形質転換し、アンビシリンを 50 μ g/ml の濃度で含む培地上で培養することにより数十個のア

ンプシリン耐性株を得た。

次に該プラスミド DNA 10 μ g を常法に従い制限酵素 Bam HI で切断し、この制限酵素反応液を 1.0% アガロースゲルによって電気泳動をすることにより目的の開始コドン ATG と終止コドン TGA を含む hHGFcDNA 断片をベクター等の目的以外の DNA 断片と分離した。Maniatis らの方法（「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ、164頁(1982)）に従いアガロースゲル断片から目的とする hHGF 遺伝子をコードする約 2.3 kb の Bam HI-Bam HIDNA 断片を調製した。得られた DNA 断片の末端を常法に従い T4DNA ポリメラーゼにて平滑末端にした後フェノール・クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿により該 DNA 断片を精製し 10 μ g の水に溶解した。

一方、発現ベクター pKCR(プロシードイング・アンド・ナチュラル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Nat. Acad. Sci.) 78 卷 1527 頁 (1981)) 0.05 μ g

- 28 -

ンビシリン耐性株を得た。

これらの組換え体を Maniatis らの方法（「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ、86 頁-96 頁(1982)）に従い解析することにより、発現ベクター pKCR のプロモーターとポリアデニレーション部位の中間に存在する制限酵素 Sma I 切断部位に hHGF 遺伝子が順方向に二連結したプラスミド、pKCRHGF-2 プラスミドを得ることが出来た。

その構造を第 4 図に示す。

[II] hHGF 蛋白質を継代的に発現する細胞株の取得

実施例 1-[I] により作製された発現ベクター pKCR(プロシードイング・アンド・ナチュラル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Nat. Acad. Sci.) 78 卷 (2) 1527 頁 (1981)) の制限酵素 Bam HI 切断部位に hHGFcDAN が二個挿入されたプラスミド pKCR HGF-2 を Maniatis らの方法（「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ、86 頁-96 頁(1982)）に従い組換え

- 29 -

-654-

- 30 -

体の大腸菌から回収、精製し HGF 発現プラスミド DNA を大量に得た。

一方形質転換細胞選択用のマーカーをコードするプラスミド pSV2neo (ジャーナル・オブ・アブレイド・ジェネティクス (Journal of Applied Genetics) 1 卷 327 頁 (1982)) を有する組換え体の大腸菌および pAd-D26-1 (ジャーナル・オブ・モレキュラ・バイオロジー (Journal of molecular biology) 第 159 卷 601 頁 (1982)) を有する組換え体の大腸菌から前述の Maniatis らの方法に従い該プラスミド DNA を回収、精製した。

得られた三種のプラスミド DNA を用いて Ausubel らの方法 (カレント・プロトコール・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology)、グリーン・パブリッシング・アソシエイツ・アンド・ウイリー・インター・サイエンス (Greene Publishing Associates and Wiley - Interscience) 9・1・1 章 ~ 9・1・4 章 (1987)) を基に CHO 細胞に二重形質転換して CHO 細胞を形質転換した。

- 31 -

けて室温で 30 分間静置した。その後 FCS が 10% 入った ERDF 培地 9 ml をシャーレに入れて、5% CO₂ 存在下、37°C で 4 ~ 5 時間培養した。次にシャーレから培地を除き 5 ml の 1 × TBS ++ 液 (1 × TBS ++ 液 ; 25 mM トリス - 塩酸 (pH 7.5)、140 mM 塩化ナトリウム、5 mM 塩化カリウム、0.6 mM 磷酸水素二ナトリウム、0.08 mM 塩化カルシウム、0.08 mM 塩化マグネシウム) で細胞を洗浄し、1 × TBS ++ 液を除去した後、グリセロールを 20% 含む 1 × TBS ++ 液 5 ml を、細胞にかけて、室温で 1 ~ 2 分間静置し、上清を除去した。その後 5 ml の 1 × TBS ++ 液で細胞を再び洗浄し、FCS が 10% 入った ERDF 培地 10 ml をシャーレに入れて 5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。培養後、48 時間が経過した時点で培地を除き、5 ml の 1 × TBS ++ 液で細胞を洗浄した後、細胞にトリプシン - EDTA 液 (シグマ社) 2 ml をかけ、室温で 30 秒静置した。その後、トリプシン - EDTA 液を除き、それから 5 分後に FCS が 10% 入った ERDF 培地 10 ml をシャーレに入れて細胞を剥が

- 33 -

即ち、まず直径 9 cm のシャーレの中で FCS (牛胎児血清) が 10% 入った ERDF 培地 (極東製薬社製) 中で CHO 細胞をセミコンフルエンントな状態になるまで培養した。次にシャーレから培地を除きそこに DNA 液を滴加するが、該 DNA 液は予め次に示す手順に従って調製した。

まず直径 9 cm のシャーレ一枚につき 300 μl の 2 × HEBS 液 (2 × HEBS 液 ; 1.6% 塩化ナトリウム、0.074% 塩化カリウム、0.05% 磷酸水素二ナトリウム 12 水塩、0.2% デキストロース、1% HEPES (pH 7.05)) と 10 μg のプラスミド DNA および 1 μg の pSV2neo プラスミド DNA、1 μg の pAd-D26-1 プラスミド DNA を加え、滅菌された水で 570 μl に合わせた溶液をエッペンドルフ遠心管中に準備する。次に該 DNA 液に 30 μl の 2.5 M の塩化カルシウム溶液を滴加しながらボルテックスミキサーを用い数秒間激しく混和する。これを室温で 30 分間放置するが、その間およそ 10 分おきにボルテックスミキサーで混和する。

この様にしてできた DNA 液を前述の細胞にか

- 32 -

し、9 cm シャーレ一枚分の細胞を 9 cm シャーレ 10 枚に分けて薬剤 G418 (G418 硫酸塩 (GENETICIN) ; GIBCO 社) を 200 μg/ml の濃度になるように加えて培養を続けた。その後 10 日が経過した時点で生き残った G418 に耐性の細胞を単離し、一つの培養用の穴がおよそ 3.1 cm² の 24 穴の培養皿を用い、それぞれ FCS が 10% 入った ERDF 培地 1 ml 中でおよそ 7 日間培養し直した。

以上の細胞の培地を FCS を含まない ERDF 培地に代えて培養を続け 72 時間が経過した細胞の培地を個別に 2 ml 集め、それをセントリコン濃縮器 (ミリポア社) で 50 μl に濃縮してそのうちの約 15 μl をサンプルとして、SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

これを常法に従いウエスタンプロット法で解析し hHGF 蛋白質の発現を確認した。

また、Gohda らの方法 (エクスペリメンタル・セル・リサーチ (Experimental Cell Research) 166 卷 139 頁 ~ 150 頁 (1986)) により hHGF 活性を測定し生物学的活性の存在を確認した。

さらに得られた細胞株は個別に単離され酵素イムノアッセイ法を行い hHGF 蛋白質の定量を行った。

その結果、発現量の確認された細胞株 B-1, B-27, B-102を得た。

実施例 2

[I] hHGF 遺伝子を有する発現ベクターを用いて繰り返し形質転換して得られる、hHGF 蛋白質を継代的に発現する細胞株の取得

実施例 1-[I]により取得した、hHGF 遺伝子発現ベクター pKCRHGF-2 及びミコフェノール酸耐性の形質転換細胞選択用のマーカーをコードするプラスミド pMBG (Nature 294, 228(1981))を有する組換え体の大腸菌から、前述の Maniatis らの方法に従い該プラスミド DNA を回収、精製した。

得られた二種のプラスミド DNA を用いて Ausubel らの方法 (カレント・プロトコール・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology)、グリーン・パブリッシング・アソシエイツ・アンド・ウイリー・インターサイエンス

(Greene Publishing Associates and Wiley - Interscience) 9-1-1 章 ~ 9-1-4 章 (1987)) を基に、実施例 1-[II] によって得られた hHGF 蛋白質を継代的に発現する細胞株のうち、hHGF の発現量の多いもの 3 株 (B-1, B-27, B-102) を単離し、それらを個別に二重形質転換して該細胞を形質転換した。

すなわち、まず直徑 9 cm シャーレの中で FCS が 10% 入った ERDF 培地で、前述の hHGF 蛋白質を継代的に発現する細胞株を個別にセミコンフルエンントな状態になるまで培養した。次にシャーンから培地を除きそこに DNA 液を滴加するが、該 DNA 液は、10 μ g の pKCRHGF-2 プラスミド DNA 及び 1 μ g の pMBG プラスミド DNA を用いる以外は、実施例 1-[II] と同様の手順で調製した。

この様にしてできた DNA 液を前述の細胞にかけて室温で 30 分間静置した。その後 FCS が 10% 入った ERDF 培地 9 ml をシャーレに入れて、5% CO₂ 存在下、37°C で 4 ~ 5 時間培養した。次にシャーレから培地を除き 5 ml の 1 × TBS++ 液 (前述) で細胞を洗浄し、1 × TBS++ 液を除去し

- 35 -

- 36 -

た後、グリセロールを 20% 含む 1 × TBS++ 液 5 ml を細胞にかけて、室温で 1 ~ 2 分間静置し、上清を除去した。その後 5 ml の 1 × TBS++ 液で細胞を再び洗浄し、FCS が 10% 入った ERDF 培地 10 ml をシャーレに入れて 5% CO₂ 存在下、37°C で培養し、48 時間が経過した時点で培地を除き、5 ml の 1 × TBS++ 液で細胞を洗浄した後、細胞にトリプシン-EDTA 液 (シグマ社) 2 ml をかけ、室温で 30 秒静置した。その後、トリプシン-EDTA 液を除き、それから 5 分後に FCS が 10% 入った α-MEM(-) 培地 10 ml をシャーレに入れて細胞を剥がし、9 cm シャーレ一枚の細胞を 9 cm シャーレ 10 枚に分けて薬剤ミコフェノール酸 (シグマ社製) を 1 μ g/ml 及びキサンチン (シグマ社製) を 250 μ g/ml の濃度になるように加えて培養を続けた。その後 10 日が経過した時点で生き残ったミコフェノール酸に耐性の細胞を単離し、一つの培養用の穴がおよそ 3.1 cm² の 24 穴の培養皿を用い、それぞれ FCS が 10% 入った ERDF 培地 1 ml 中でおよそ 7 日間培養し直した。

以上の細胞の培地を FCS を含まない ERDF 培地に代えて培養を続け 72 時間が経過した細胞の培地を個別に 2 ml 築め、それらをセントリコン濃縮器 (ミリポア社) で 50 μ l に遠心濃縮してそのうち約 15 μ l をサンプルとして SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

これを常法に従いウエスタンブロット法で解析し hHGF 蛋白質の発現を確認した。

また、Gohda らの方法 (エクスペリメンタル・セル・リサーチ (Experimental Cell Research) 166 卷 139 頁 ~ 150 頁 (1986)) により hHGF 活性を測定し生物学的活性の存在を確認した。

その結果を第 5 図に示す。

さらに、得られた細胞株のうちいくつかを個別に単離し酵素イムノアッセイ法で hHGF 蛋白質の発現量を確認した結果、二重形質転換前の細胞株 B-102 の発現量のおよそ 20 倍の発現量を示す細胞株 BD-24 を得た。

(発明の効果)

本発明に係わる hHGF 遺伝子を挿入された発現

- 37 -

- 656 -

- 38 -

ベクターを宿主細胞に導入することにより、今まで困難であった生物学的活性を有する hHGF 蛋白質を大量、安定かつ容易に生産することが可能となる。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図はヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子の塩基配列を表わす。

第 2 図はヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子から推定されるアミノ酸配列を示す。

第 3 図は、ヒト肝実質細胞増殖因子を発現するベクターを構築する工程を表わす。

第 4 図は、本発明のヒト肝実質細胞増殖因子をコードする DNA を有する発現ベクターの構造を表わす。

第 5 図は、本発明のヒト肝実質細胞増殖因子をコードする DNA を有する発現ベクターを有する CHO 細胞が産生するヒト肝実質細胞増殖因子を含む培養上清の生物学的活性を示したものである。

第1回(401)

ATG TGG GTG ACC AAA CTC CTC CCA GCC CTG CTG CTG CAG CAT GTC CTC CTC CTG CAT CTC CTC CTC
 60
 CTG CTC CCC ATC GCC ATC CCC TAT GCA GAG GGA CAA AGG AAA AGA AAT ACA ATT CAT
 P_{s1} 120
 GAA TTC AAA TCA GCA AAG ACT ACC CTA ATC AAA ATA GAT CCA GCA CTG AAG ATA AAA
 Eco RI 180
 ACC AAA AAA GTG AAT ACT GCA GAC CAA TGT GCT AAT AGA TGT ACT AGG AAT AAA GGA CTT
 P_{s1} 240
 CCA TTC ACT TGC AAG GCT TTT GTT TTT GAT AAA GCA AGA AAA CAA TGC CTC TGG TTC CCC
 300
 TTC AAT AGC ATG TCA AGT GGA GTG AAA AAA GAA TTT GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA
 360
 AAC AAA GAC TAC ATT AGA AAC TGC ATC ATT GGT AAA GGA CGC AGC TAC AAG GGA ACA GTA
 420
 TCT ATC ACT AAG AGT GGC ATC AAA TGT CAG CCC TGG AGT TCC ATA CCA CAC GAA CAC
 480
 AGC TTT TTG CCT TCG AGC TAT CGG GGT AAA GAC CTA CAG GAA AAC TAC TGT CGA AAT CCT
 540
 CGA GGG GAA GAA GGG GGA CCC TGG TGT TTC ACA AGC AAT CCA GAG GTA CGC TAC GAA GTC
 Xho 1 600
 TGT GAC ATT CCT CAG TGT TCA GAA GTT GAA TGC ATG ACC TGC AAT GGG GAG AGT TAT CGA
 660
 GGT CTC ATG GAT CAT ACA GAA TCA GGC AAG ATT TGT CAG CGC TGG GAT CAT CAG ACA CCA
 720
 CAC CGG CAC AAA TTC TTG CCT GAA AGA TAT CCC GAC AAG GGC TTT GAT GAT AAT TAT TGC
 780

1 (402)

CGC AAT CCC GAT GGC CAG CCG AGG CCA TGG TGC TAT ACT CTT GAC CCT CAC ACC CGC TGG 840
 GAG TAC TGT GCA ATT AAA ACA TGC GCT GAC AAT ACT ATG AAT GAC ACT GAT GTT CCT TTG 900
 GAA ACA ACT GAA TGC ATC CAA GGT CAA GGA GAA GGC TAC AGG GGC ACT GTC AAT ACC ATT 960
 TGG AAT GGA ATT CCA TGT CAG CGT TGG GAT TCT CAG TAT CCT CAC GAG CAT GAC ATG ACT 1020
 Eco RI
 CCT GAA AAT TTC AAG TGC AAG GAC CTA CGA GAA AAT TAC TGC CGA AAT CCA GAT GGG TCT 1080
 GAA TCA CCC TGG TGT TTT ACC ACT GAT CCA AAC ATC CGA GTT GGC TAC TGC TCC CAA ATT 1140
 CCA AAC TGT GAT ATG TCA CAT GGA CAA GAT TGT TAT CGT GGG AAT GGC AAA AAT TAT ATG 1200
 GGC AAC TTA TCC CAA ACA AGA TCT GGA CTA ACA TGT TCA ATG TGG GAC AAG AAC ATG GAA 1260
 GAC TTA CAT CGT CAT ATC TTC TGG GAA CCA GAT GCA AGT AAG CTG AAT GAG AAT TAC TGC 1320
 CGA AAT CCA GAT GAT GCT CAT GGA CCC TGG TGC TAC ACG GGA AAT CCA CTC ATT CCT 1380
 TGG GAT TAT TGC CCT ATT TCT CGT TGT GAA GGT GAT ACC ACA CCT ACA ATA GTC AAT TTA 1440
 GAC CAT CCC GTC ATA TCT TGT GCC AAA ACG AAA CAA TTG CGA GTT GTC AAT GGG ATT CCA 1500
 ACA CGA ACA AAC ATA GCA TGG ATG GTT AGT TTG AGA TAC AGA AAT AAA CAT ATC TGC GGA 1560
 GGA TCA TTG ATA AAG GAG AGT TGG GTT CTT ACT GCA CGA CAG TGT TTC CCT TCT CGA GAC 1620
 Xho I

第1回(173)

TTG AAA GAT TAT GAA GCT TGG CTT GGA ATT CAT GAT GTC CAC GGA AGA GGA GAT GAG AAA
¹⁶⁸⁰
 Eco RI
 TGC AAA CAG GTT CTC AAT GTT TCC CAG CTG GTA TAT GGC CCT GAA GGA TCA GAT CTG GTT
¹⁷⁴⁰
 TTA ATG AAG CTT GCC AGG CCT GCT GTC CTG GAT GAT TTT GTT AGT ACG ATT GAT TTA CCT
¹⁸⁰⁰
 AAT TAT GGA TGC ACA ATT CCT GAA AAG ACC AGT TGC AGT GTT TAT GGC TGG GGC TAC ACT
¹⁸⁶⁰
 GGA TTG ATC AAC TAT GAT GGC CTA TTA CGA GTG GCA CAT CTC TAT ATA ATG GGA AAT GAG
¹⁹²⁰
 AAA TGC AGC CAG CAT CGA GGG AAG GTG ACT CTG AAT GAG TCT GAA ATA TGT GCT GGG
¹⁹⁸⁰
 GCT GAA AAG ATT GGA TCA GGA CCA TGT GAG GGG GAT TAT GGT GGC CCA CTT GTT TGT GAG
²⁰⁴⁰
 CAA CAT AAA ATG AGA ATG GTT CTT GGT GTC ATT GTT CCT GGT CGT GGA TGT GCC ATT CCA
²¹⁰⁰
 AAT CGT CCT GGT ATT TTT GTC CGA GTA GCA TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC AAA ATT ATG
²¹⁶⁰
 TTA ACA TAT AAG GTA CCA CAG TCA TAG
 Kpn I

第2回(491)

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu
 Leu Leu Gin His Val Leu Leu His Leu Leu
 Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu
 Glu Gin Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His
 Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu
 Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys
 Thr Lys Val Asn Thr Ala Asp Gin Cys
 Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Glu Leu
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp
 Lys Ala Arg Lys Gin Cys Leu Trp Phe Pro
 Phe Asn Ser Met Ser Ser Gin Val Lys Lys
 Glu Phe Glu His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu
 Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile
 Glu Lys Glu Arg Ser Tyr Lys Glu Thr Val
 Ser Ile Thr Lys Ser Gin Ile Lys Cys Gin
 Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Glu Lys
 Asp Leu Gin Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
 Arg Glu Glu Glu Glu Glu Pro Trp Cys Phe

第2回(492)

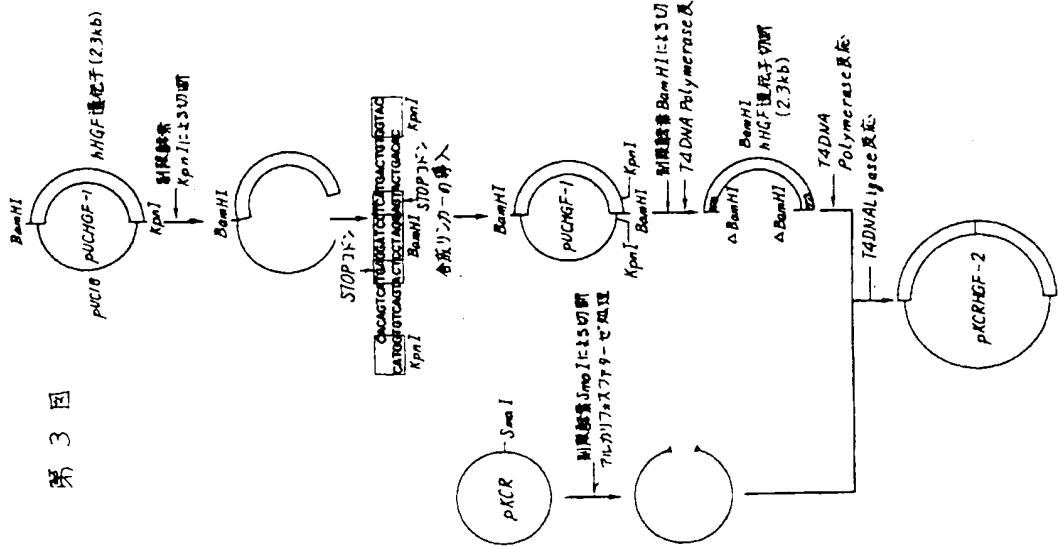
Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val
 Cys Asp Ile Pro Gin Cys Ser Glu Val Glu
 Cys Met Thr Cys Asn Glu Glu Ser Tyr Arg
 Glu Leu Met Asp His Thr Glu Ser Glu Lys
 Ile Cys Gin Arg Trp Asp His Gin Thr Pro
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr
 Pro Asp Lys Glu Phe Asp Asp Asn Tyr Cys
 Arg Asn Pro Asp Glu Gin Pro Arg Pro Trp
 Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp
 Glu Tyr Cys Ala Tyr Lys Thr Cys Ala Asp
 Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu
 Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gin Glu Gin Gly
 Ile Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gin Arg Trp Asp
 Ser Gin Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr
 Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Glu Ser
 Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro
 Asn Ile Arg Val Glu Tyr Cys Ser Gin Ile

第2回(473)

Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp
 Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu
 Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu
 Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro
 Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys
 Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro
 Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro
 Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu
 Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr
 Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro
 Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser
 Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly
 Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu
 Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp
 Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile
 His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu

第2回(474)

Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val
 Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu
 Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro
 Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr
 Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr
 Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val
 Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly
 Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu
 Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu
 Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val
 Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro
 Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala
 Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser *



四
三
七

四四

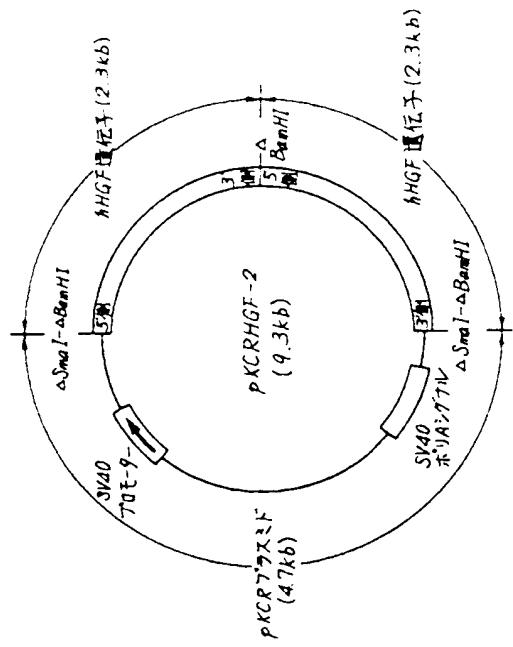
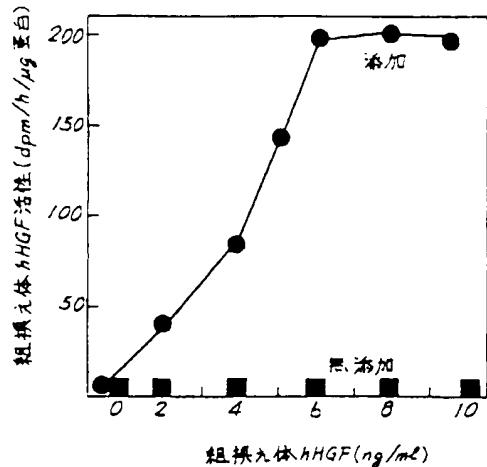


図 5



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 5
 // C 12 N 15/12
 (C 12 P 21/02
 C 12 R 1:91) 識別記号 ZNA 庁内整理番号

⑥発明者 芳山 美子 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成株式会社
 総合研究所内

⑥発明者 石井 健久 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成株式会社
 総合研究所内

⑥発明者 高橋 和展 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成株式会社
 総合研究所内